

# INVESTIGAÇÕES SÔBRE INIBIDORES PARA O VÍRUS DA POLIOMIE-LITE, PRESENTES EM SOROS DE BOVINOS \*

Hermann G. Schatzmayr \*\*

*Inibidores contra as amostras de poliovírus do tipo 1, Mahoney e CHAT, foram estudados no sistema de gel de hidróxido de alumínio. O inibidor comportou-se como uma macroglobulina do tipo 19 S (IgM), através filtração em gel (Sephadex G-200), partição em DEAE-Celulose e sedimentação por ultra-centrifugação em gradiente de sacarose. O inibidor foi ainda destruído através o tratamento com 2-Mercapto-Etanol.*

*O inibidor une-se à superfície do vírus na ausência de células. O complexo formado pelo vírus e o inibidor pode ser precipitado por um soro preparado contra a globulina bovina; o mesmo complexo dissocia-se em idêntico valor de pH ao do complexo vírus-anticorpo 19 S.*

*A chamada infeciosidade residual (cêrca de 10%) que permanece após a neutralização de poliovírus com soro bovino representa uma dissociação parcial do inibidor da partícula de vírus, quando em presença das células em cultura.*

*Foram obtidas amostras de vírus resistentes à ação específica de soros bovinos. Estas amostras permanecem sensíveis à ação de outros soros bovinos ativos, bem como à ação de anticorpos 7 S e 19 S.*

*Através experiências de adsorção de atividade inibidora, foi possível mostrar a existência de inibidores monoespecíficos, com diferentes especificidades contra as amostras CHAT e Mahoney, respectivamente.*

## INTRODUÇÃO

A ação inibidora de soros animais, normais sôbre a multiplicação de vírus e sua influência perniciosa em investigações sorológicas e em especial em testes de inibição da hemaglutinação, são de longa data conhecidas. Estas substâncias são classificadas ou em função dos vírus sôbre os quais exerçam sua ação, quer sôbre a multiplicação dos mesmos, quer sôbre a sua capacidade hemaglutinante ou então em função de sua própria natureza. Exatamente esta natureza apresenta uma caracterização ainda incompleta. Inicialmente torna-se necessário provar que a atividade inibidora do soro não está relacionada aos

ímune-anticorpos adquiridos. Como ponto de referência, foi usado inicialmente para esta diferenciação a inativação da ação inibidora pelo aquecimento a 56° C. No entanto, freqüentemente são observados, através o uso de outros critérios de diferenciação, a presença de inibidores termo-resistentes. Finalmente não é possível distinguir, algumas vêzes, os inibidores das ímune-globulinas, ou seja dos anticorpos, pela simples determinação de sua natureza. Assim sendo, existe na atualidade um quadro bastante variado de inibidores de diferentes naturezas e que agem de diferentes maneiras sôbre os vírus a êles sensíveis. Destas substâncias as melhores estudadas são os inibidores da hemaglutina-

(\*) Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Virologia da Universidade de Giessen, na República Federal Alemã, em dezembro de 1966.

(\*\*) Professor-Adjunto de Microbiologia do Departamento de Ciências Biológicas da Fundação Ensino Especializado de Saúde Pública. Ex-Bolsista da Fundação Humboldt.

ção dos *Myxovirus*. Menos conhecidos e estudados são os inibidores presentes em soros animais que agem sobre a multiplicação dos enterovirus, em especial do vírus da poliomielite. A presente investigação refere-se unicamente aos inibidores presentes em soros de animais e que são ativos contra enterovirus e baseia-se nos seguintes fatos básicos, que servem de ponto de partida ao trabalho.

Principalmente em soros de bovinos mas também no de equinos, são identificadas substâncias que impedem a multiplicação do vírus da pólio. As descrições encontradas na literatura sobre a caracterização destas substâncias, as colocam no grupo das imune-globulinas ou seja, poderiam tratar-se de anticorpos. No entanto existem diferenças entre estes inibidores e os anticorpos neutralizantes. Assim, existem amostras de vírus, pertencentes ao mesmo tipo sorológico, que são resistentes à ação inibidora de um determinado soro bovino. Estas amostras resistentes tanto podem ser encontradas naturalmente, como selecionadas pela multiplicação na presença do soro inibidor. Por outro lado, mutantes resistentes aos anti-soros tipo-específicos não foram até o momento conseguidas. As mutantes resistentes a determinado soro deixam-se neutralizar por outros soros bovinos em maior ou menor grau. Não está bem definido, no entanto, se amostras de pólio vírus do mesmo tipo sorológico possuem os mesmos pontos de união na superfície do vírus para um determinado inibidor. Esta observação mostra que o estudo destes inibidores poderia levar à confecção de um sistema de propriedades do capsídeo do vírus de tal sorte que seria constituído um esquema de identificação de amostras, como por exemplo o de Kauffmann-White para *Salmonellas*, seja no interesse de investigações genéticas, seja simplesmente no interesse do esclarecimento dos aspectos funcionais e estruturais do capsídeo do vírus da poliomielite.

A presente investigação teve por objetivo analisar as relações entre inibidores de soro bovino que possuem especificidade de amostras e o vírus da poliomeilite, em um sistema *in vitro*, na ausência de células. Isso permitiu a análise dos receptores do capsídeo de poliovirus em um sistema, em que são eliminados os fatores de origem celular. Analisou-se ainda a natureza do

inibidor de uma maneira mais detalhada do que até então, bem como comparou-se a ligação dos inibidores aos virus com a ligação dos imune-anticorpos.

Para uma perfeita delineação da posição do trabalho, uma rápida revisão de literatura será a seguir apresentada:

Flexner e Lewis (8) durante o decorrer de investigações sobre a soroterapia da poliomielite demonstraram, já no ano de 1910, a presença, no soro de cabras normais, de fatores termo-resistentes (56° C, 30 minutos) os quais, da mesma maneira que os anticorpos, afetavam a infecciosidade de medulas de macacos infectados com o vírus da poliomielite. Posteriormente investigações foram possíveis quando da adaptação do vírus da poliomielite a animais de laboratório (ratos e camundongos) por Armstrong (2). Hammon et al. (11) investigaram soros de animais selvagens e domésticos em relação a sua atividade neutralizante contra a amostra Lansing e encontraram nos animais domésticos um título mais elevado. Sabin e Fieldsteel (24) encontraram no colostro e sangue de bovinos, substâncias também ativas contra a amostra Lansing. Bartell e Klein (3) e Mc Ferran (19) demonstraram no soro de bovinos, adultos, fatores de inibição contra todos os três tipos de poliomielite. Nos primeiros estudos sobre a multiplicação de poliovirus em cultura de tecidos (23), determinou-se uma ação inibidora do sangue de cavalo que tinha sido acrescentado como fator estimulante do crescimento celular. Substâncias semelhantes foram também determinadas em soros de coelhos (20, 26). Por outro lado, foram demonstradas, no soro de humanos, substâncias ativas contra enterovirus de origem bovina, com ação inibidora da multiplicação.

Algumas qualidades dos chamados inibidores presentes em soros de bovinos e equinos os aproximam bastante dos anticorpos, a saber:

- 1 — Eles são formados no organismo do próprio animal. Em alguns casos e especialmente em animais jovens, não são demonstráveis (19).
- 2 — Os inibidores possuem algumas vezes uma alta especificidade (3, 19).
- 3 — Os inibidores são precipitáveis com sulfato de amônio a meia concentração, comportando-se como globuli-

nas. Aparecem após filtração com Sephadex G-200 na fração das macroglobulinas (21).

- 4 — Os títulos alcançados individualmente pelos animais são extremamente variados e surgem durante diferentes pontos do desenvolvimento.
- 5 — Investigações sobre a cinética da neutralização *in vitro* permitem a conclusão de que, na ausência de células, também ocorre a união do inibidor com o antígeno (29). Take-moto et al. (27) não puderam, com soros de equinos, demonstrar uma ação *in vitro* dos inibidores, o que foi no entanto posteriormente demonstrado (28).

Difícil torna-se, no entanto, o esclarecimento da origem destes inibidores. Tentativas de infecções de bovinos com poliovírus resultaram negativas (24, 32). Uma descrição de Koprowski do isolamento de poliovírus das fezes de um bovino com a demonstração do aumento do título de anticorpos circulantes permanece como única (veja Mc Ferran et al. (18)).

Uma diferenciação entre os anticorpos tipo-específicos neutralizantes e os inibidores pode ser encontrada nas descrições seguintes de diversos autores.

Após a descrição da técnica de placa por Dulbecco e Vogt (5), investigaram Take-mori et al. (29) a formação de placas de poliovírus tipo 1 e 2 na presença de agar contendo soros bovinos com inibidores. As placas que se desenvolveram eram menores e em menor número do que no controle. Algumas placas possuíam, no entanto, tamanho normal. Pela passagem destas últimas placas, obteve-se amostras de vírus que não mais eram sensíveis à ação inibidora do soro bovino. Hirst (13) conseguiu através experiências de recombinação, mutantes duplas, as quais eram resistentes ao mesmo tempo a um soro equino e um soro bovino, partindo de amostras individualmente resistentes a um e outro soro, respectivamente. Ledinko (15) conseguiu também mutantes duplas, por técnicas semelhantes, as quais eram resistentes à ação de um soro de cavalo e de guanidina. Pagano e Böttinger (20) descreveram um soro de bovino que era ativo seletivamente contra a amostra de poliovírus atenuada

CHAT (poliovírus tipo 1) e também ativo contra amostras obtidas após a vacinação de crianças com esta amostra atenuada. Em investigações posteriores Pagano et al. (21) obtiveram amostras resistentes de CHAT. A resistência de uma amostra de poliovírus contra os anticorpos neutralizantes tipo específicos não foi até agora descrita.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1 — Preparo das culturas de células

Tubos e garrafas contendo células de rim de macaco *Rhesus* foram preparadas segundo métodos descritos por Youngner (33).

### 2 — Soluções

- a — Para cultura de células, foi usada uma solução a 0,5% de hidrolisado de lactoalbumina (Biochemical Corporation) em solução de Hanks com 5% de soro bovino, bicarbonato de sódio e antibióticos. Para a multiplicação de vírus, o meio não continha soro de bovino.
- b — Tampões: Para adsorção de vírus ao hidróxido de alumínio (30, 31), foi usado um tampão especial que constou de um tampão de fosfato segundo Sørensen com a adição de 0,1 M Tris. HCl, pH 7,5. A molaridade do tampão de fosfato foi ajustada a valores adequados (= Tampão fosfato/Tris). Para as diluições de vírus e soro foi usado um tampão constando de partes iguais de solução de Hanks e Tris. HCl 0,1 M, pH 7,5 (= Tris Hanks/Tris).

### 3 — Amostras de vírus

Foram utilizadas as amostras de poliovírus tipo 1, Mahoney e CHAT, esta última uma amostra atenuada usada para a vacinação oral.

### 4 — Cultivo de amostras de vírus resistentes e inibidores

A amostra Mahoney é sensível à ação inibidora do soro bovino n.º 8 (SB 8). A amostra CHAT é sensível à ação inibidora do soro bovino n.º 12. De ambas foram

isoladas variantes, as quais são resistentes à ação inibidora dos soros respectivos. Estas variantes foram isoladas da seguinte maneira: as amostras de vírus foram cultivadas em células de rim de macaco, em presença do soro bovino inibidor e após cerca de 10-15 passagens, foi determinada a sensibilidade das amostras em testes de neutralização (cinética), segundo técnica adiante descrita. Quando a população de vírus de uma determinada passagem apresentava uma já diminuta sensibilidade à ação do soro, a seleção passou a ser realizada no sistema de gel de hidróxido de alumínio (30, 31). Finalmente foram isoladas amostras resistentes, pela multiplicação de placas isoladas obtidas sob agar. A obtenção final das amostras de vírus foi realizada na ausência de soro.

#### 5 — Marcação das amostras de vírus com <sup>32</sup>P

Usaram-se técnicas anteriormente descritas após padronização adequada (16, 31).

#### 6 — Soros

Soros de bovinos adultos foram obtidos em matadouros. Imune-anticorpo do tipo 19 S de coelho contra o vírus da poliomielite foi preparado de acordo com Svehac (26) e testado antes do uso, em relação a sua sensibilidade ao 2-Mercapto-Etanol.

Imune-anticorpos do tipo 7 S igualmente de coelhos, foram obtidos através imunizações com vírus com altos títulos i.m. e i.v. e fracionados em DEAE-Celulose antes do uso (7). Anticorpos precipitantes para globulina bovina foram obtidos através a imunização de coelhos com cerca de 20 ml de globulina bovina, a qual não possuía atividade inibidora contra as amostras CHAT e Mahoney.

#### 7 — Testes de neutralização

Foram realizados segundo as técnicas de Dulbecco et cols. (6). O título é expresso em pfu/ml.

#### 8 — Titulação dos soros em cultura de tecidos

A atividade inibidora pode ser também determinada em cultura de tecidos, em tu-

bos, através a imuno-inativação, Gard (9). O título final do soro é então definido como uma diluição na qual 50% dos tubos inoculados mostram um efeito citopatológico em presença de 10-15 TCID<sub>50</sub>. Este método resulta em valores menos exatos, pois após a 4.º dia de incubação, uma fração de partículas não neutralizadas ocasiona a destruição das células.

#### 9 — DEAE — Celulose

Os soros foram dializados por uma noite contra tampão de fosfato 0,02 M em pH 8,0. As colunas (10 cm de altura e 1 cm de diâmetro) foram lavadas com o mesmo tampão, cuidadosamente, até que pH uniforme foi alcançado. Após adição de 2 ml de soro, eluados foram obtidos com a adição de porções de 2 ml de tampão as quais possuíam molaridade crescente e valores de pH decrescentes. Cada coluna forneceu cerca de 40 frações, dentro das quais toda a atividade ótica pode ser determinada. As medidas foram realizadas com um fotômetro Zeiss (tipo PMQ II) em um comprimento de onda de 280 m $\mu$ . De cada fração foram medidas, além disso, a atividade inibidora em cultura de tecidos e em testes de adsorção.

#### 10 — Sephadex G-200

15 g do produto foram dissolvidos em cerca de um litro de tampão (0,1 M NaCl e 0,1 M tampão Tris, pH 8,0) e cuidadosamente lavados, com o mesmo tampão, em uma coluna de vidro (5 x 40 cm). 5 ml de soro dialisado contra o mesmo tampão foram adicionados à coluna e frações de 5 ml consecutivamente colhidas. As frações foram investigadas como acima descrito.

#### 11 — Gradiente de sacarose

Soluções de sacarose de 40%, 32%, 24%, 16%, e 10% (g/vol.) em água bi-destilada, foram cuidadosamente superpostas na temperatura ambiente, em um tubo de centrifugo, 0,8 ml de cada solução. Após uma noite a 4º C, adicionaram-se 0,5 ml de total e Bayol 55 (Esso Co.) Os tubos foram centrifugados em uma centrífuga Spinco (Beckman-Instruments, Rotor SW 39) por 8 horas a 38.000 r.p.m. As frações foram colhidas, após perfuração do tubo com uma

agulha 16. Cada fração (6 gotas) foi colhida em água e investigada para sua densidade ótica e atividade inibidora.

#### 12 — *Tratamento com 2-Mercapto-Etanol*

As substâncias inibidoras presentes no soro foram investigadas de acordo com as técnicas de Svehag (26). Os soros foram incubados na presença de 2-Mercapto-Etanol (concentração final 0,2 M) por uma noite a 4° C. A ação do 2-Mercapto-Etanol foi estudada no sistema gel de hidróxido de alumínio, usando-se <sup>32</sup>P-Vírus, como será descrito no capítulo III. (4).

#### 13 — *Técnica de adsorção em gel*

Esta técnica foi usada para determinar a atividade de anticorpos de coelhos ou dos inibidores presentes no soro de bovinos, segundo métodos já descritos (31).

#### 14 — *Gel de hidróxido de alumínio*

Nas concentrações usadas (0,6 mg/ml) o gel é estável e adsorve, entre os pH 5,0 e 9,0 e em concentração de fosfato de 0,005 M, quase completamente as partículas de vírus da poliomielite.

#### 15 — *Técnicas de absorção de soros*

As absorções de atividades de soros foram realizadas com vírus não marcados e a atividade residual testada com vírus marcados, como acima descrito.

#### 16 — *Técnicas de precipitação*

Empregaram-se os métodos de Gerloff et cols. (10) com amostras marcadas de poliovírus, resistentes e não resistentes à ação de soros inibidores.

#### 17 — *Dissociação pelo pH*

A dissociação por ação do pH de complexos vírus-anticorpos ou vírus-inibidor realizaram-se basicamente segundo as técnicas de Mandel (17). As misturas foram

ajustadas a um pH ácido e assim mantidas por 30 minutos a temperatura ambiente. O pH foi então reconduzido a valores de neutralidade através tampão do Tris. HCl. Os produtos de dissociação foram então examinados através a adição do tampão fosfato/Tris e gel de hidróxido de alumínio.

#### 18 — *Determinação da atividade do <sup>32</sup>P*

As medidas da radioatividade foram realizadas por meio de um aparelho de fluxo de metano em conexão com cambiador automático de amostras e um contador de impulsos (equipamento da firma Friesacke & Hoepfner, n.º 407). As provas para contagem foram colocadas em cápsulas de metal e secas em forno após a adição de uma gota de Arlacel, visando melhor uniformidade de distribuição na superfície. Via de regra contaram-se pelo menos 1000 impulsos.

## RESULTADOS

### I — *Fenômeno básico*

<sup>32</sup>P-poliovírus (Mahoney) quando em presença de um excesso de anticorpo imune de coelho dos tipos 19-S e 7-S e um controle contendo soro normal de bovino livre de inibidores, ao ser estudado no sistema de gel de hidróxido de alumínio, apresenta o seguinte comportamento. (Fig. 1).

Enquanto que o vírus incubado com soro de bezerro liga-se fracamente ao adsorvente, as misturas vírus e anticorpos 19-S e 7-S unem-se mais fortemente e em diferentes maneiras ao gel. Complexos formados por vírus e anticorpos 7-S ligam-se mais fortemente do que os complexos vírus-19-S. As curvas de eluição obtidas com o mesmo soro são constantes, elas variam ao serem usadas outros soros em cerca de mais ou menos 10% do valor do fosfato que produz 50% de eluição. É possível demonstrar que complexos vírus-anticorpos e não vírus livre eluem do adsorvente.

### 2 — *Comportamento de soros de bovinos*

Diferentes soros bovinos, após inativa-

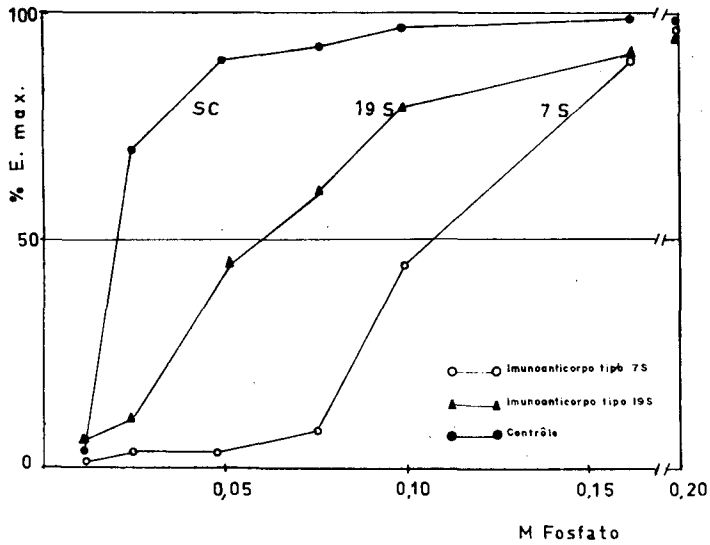
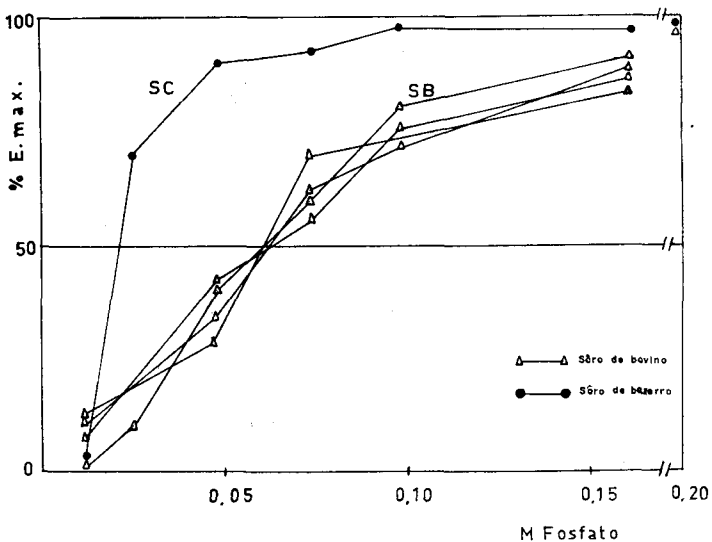


Figura 1: — Curvas de eluição de complexos formados com  $^{32}$ P-poliovirus amostra Mahoney com imuno-anticorpos tipo 7 S e 19 S. Controle: Comportamento de virus após incubação com soro de bezerro livre de inibidores.

Os valores de fosfato assinalados correspondem a concentração final sobrenadante, após a centrifugação do gel de hidróxido de alumínio. O valor 100% de eluição é dado pela atividade no sobrenadante da mistura virus-soro de bezerro em 0,2 M de fosfato.



diferentes sôros de bovino em comparação com misturas virus-soro de bezerro como controle.  
Figura 2: — Curvas de eluição do virus Mahoney com  $^{32}$ P, o qual foi incubado com

ção a 56° C por 30 minutos, foram da mesma maneira acima descrita investigados.

Em alguns soros, como mostrado na Figura 2, demonstrou-se a presença de substâncias as quais conduziram a uma forte união do vírus do adsorvente. A posição da curva de eluição corresponde aproximadamente à posição das curvas de eluição dos complexos de vírus com anticorpos tipo

19 S. Um desvio da curva para valores maiores do que 0,06 M de fosfato não foi observado nem mesmo com a adição de quantidades maiores do soro bovino, após uma primeira incubação, a 37° C por uma hora. A comparação entre os soros examinados mostra uma diferença insignificante nas curvas de eluição obtidas.

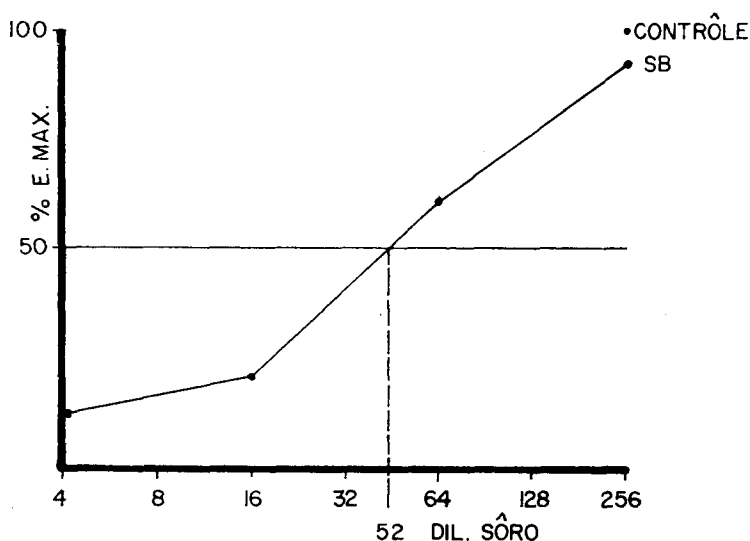


Figura 3: Titulação de um soro inibidor no sistema gel e hidróxido de alumínio. Concentração de fosfato = 0,016 M. Valor 100% = eluição de uma mistura vírus-soro de Lezzer. A diluição do soro de 1/52 representa uma UIC (unidade inibidora cromatográfica).

A atividade presente nos soros bovinos é que modifica a eluição do poliovírus tipo 1 e pode também ser titulada no mesmo sistema do gel de hidróxido de alumínio, desde que seja mantida uma concentração de fosfato na qual haja seguramente adsorção ao gel e seja o soro diluído convenientemente. A posição da curva passa então a ser função da diluição do soro. Como título do soro considera-se a diluição que causa uma eluição de 50% no contrôle. Nesta diluição o soro contém por definição, uma unidade inibidora cromatográfica (UIC) por mililitro.

3 — *Comparação da atividade inibidora em teste de neutralização e em teste de adsorção em gel.*

É necessário primeiramente provar que a mesma substância que mostra sua atividade no teste de cromatografia em gel é capaz de inibir a multiplicação de vírus em testes de neutralização.

a — *Correlação de títulos*

20 diferentes soros de bovinos foram titulados em testes de neutralização (células de rim de macaco em tubos) e ao mesmo tempo no sistema de adsorção em gel. O resultado é apresentado na Figura 4. Considerando a margem do erro do sistema biológico e a dificuldade de leitura do efeito citopatogênico após a 4.º dia da incubação, observa-se uma boa correlação entre os títulos através dos dois métodos. Este fato

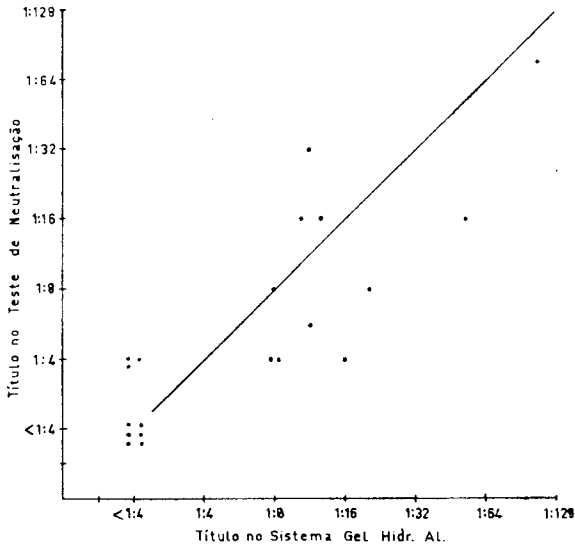


Figura 4: — Titulação de 20 sôros bovinos em testes de neutralização em células de rim de macaco (teste em tubos = leitura no 4º dia) e paralelamente em sistema gel do hidróxido de alumínio, usando-se a amostra Mahoney de poliovirus.

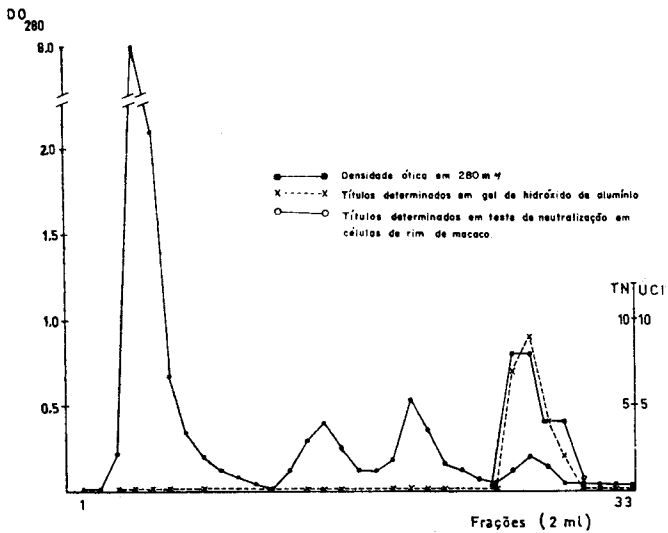


Figura 5: — Desdobramento em DEAE-Celulose de um sôro de bovino contendo substâncias inibidoras. A linha mostra densidade ótica em 280 mμ. O título das diferentes frações foram determinadas em sistema de gel de hidróxido de alumínio e em teste de neutralização em células da rim de macaco. A atividade do sôro, medida nos dois sistemas encontra-se nas mesmas frações.



deve ser considerado como primeira indicação de que a atividade *in vitro* está ligada diretamente ao inibidor.

b — Uma correlação semelhante realizada com as frações colhidas após a separação em DEAE-Celulose de um soro inibidor de bovino, mostra (Figura 5) que na fração 7 S nenhuma atividade inibidora pode ser determinada, porém nas frações colhidas posteriormente correspondentes as macroglobulinas, um efeito inibidor é claramente demonstrado. Assim observa-se que a atividade inibidora encontrada nos dois sistemas de teste, *in vitro* e *in vivo*, demonstra-se nas mesmas frações do soro, o que é uma indicação a mais de que se trata da mesma substância.

c — Poliovírus tipo 1, amostra Mahoney, foi neutralizado através o soro de bovino n.º 8, porém uma variante em presença deste soro e que chamaremos bo 8 é resistente à ação do soro acima. Este fato pode ser observado na figura 6 onde é apresentada a cinética da neutralização das duas variantes de vírus. A amostra Mahoney bo+ é inativada pelo soro bovino n.º 8 em cerca de um logaritmo (O caráter da fração residual não inativada pelo soro será posteriormente estudado). Em presença do soro de bezerro o mesmo vírus será apenas ligeiramente afetado. A amostra bo 8 não é inativada nem pelo soro de bezerro nem pelo soro bovino n.º 8. (Fig. 6a).

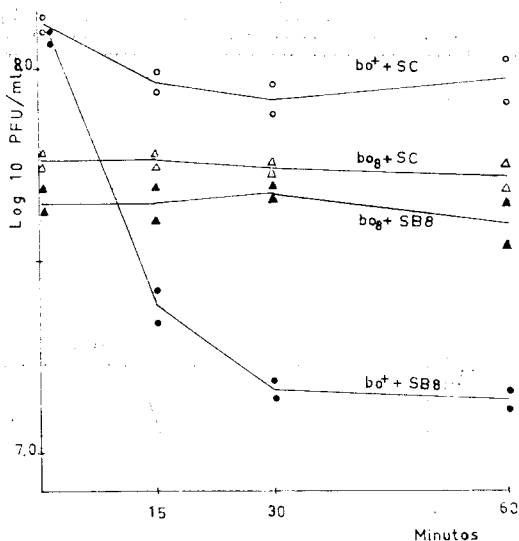


Figura 6a: — Cinética na neutralização de amostras de poliovírus Mahoney sensível (bo+) e resistentes (bo 8) contra o mesmo soro (SB 8). O soro age contra a amostra sensível e a fração não neutralizável é reconhecível. A amostra resistente não é atingida pelo soro.

O exame das duas amostras de vírus após marcação com isótopos fornece resultados semelhantes (Figura 6b). A amostra resistente de poliovírus bo 8 comporta-se de maneira semelhante no teste cromatográfico

quando misturada com soro de bovino n.º 8 bem como após incubação com soro de bezerro. Comportamento semelhante apresenta a amostra Mahoney quando incubada com soro de bezerro.

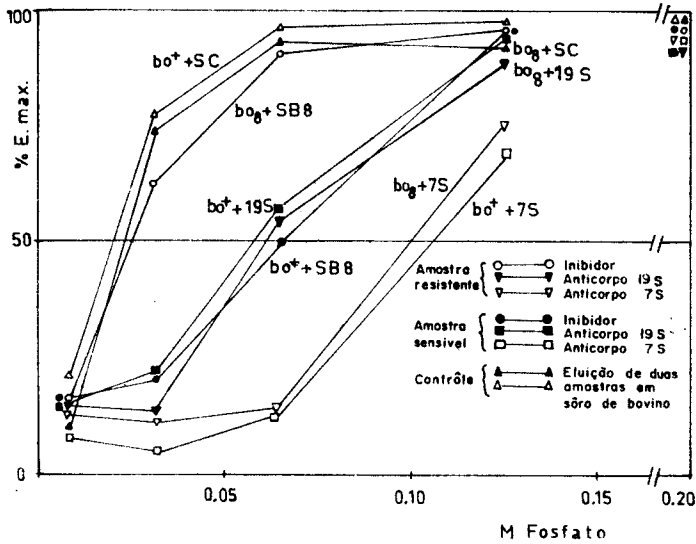


Figura 6b: — Comportamento das amostras Mahoney bo8 e bo+ no sistema de gel de hidróxido de alumínio. A amostra resistente não é ligada ao inibidor, porém, liga-se aos anticorpos 19 S e 7 S. A amostra sensível liga-se ao inibidor, bem como aos anticorpos 19 S e 7 S. Contrôles: Eluição das duas amostras na presença de sôro de bovino.

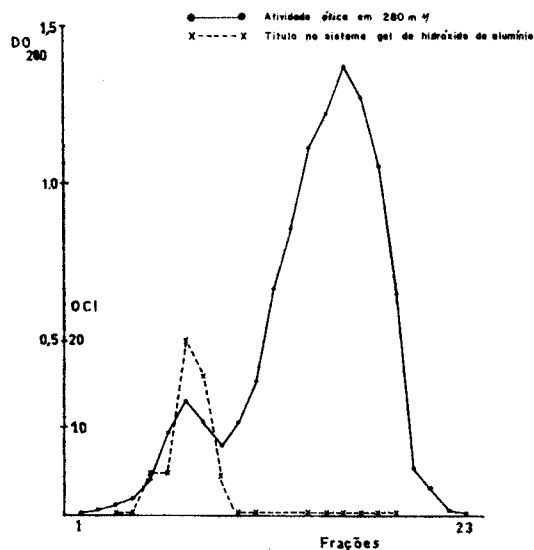


Figura 7: — Sedimentação da atividade inibidora em gradiente de sacarose (8 horas, 38.000 r.p.m., Rotor Spincó S W 39, concentrações de sacarose 10%, — 40%). A atividade do sôro está inteiramente contida nas frações mais pesadas.

Além disso verifica-se que, tanto as amostras resistentes como as sensíveis, continuam sendo neutralizadas pelos anticorpos 19 S e 7 S preparados em coelhos, o que corresponde exatamente ao comportamento das mesmas amostras em testes de neutralização em cultura de tecidos.

#### 4 — Caracterização do inibidor

As substâncias inibidoras do soro de bovino foram estudadas com mais detalhe visando sua caracterização. As titulações da atividade inibidora foram realizadas *in vitro*, tendo em vista uma maior exatidão. O fracionamento em DEAE Celulose (Figura 5) e o comportamento no sistema de gel de hidróxido de alumínio (Figura 2) forneceram as primeiras indicações de que o inibidor pertence à classe das macroglobulinas. A investigação da sedimentação do inibidor em gradiente de sacarose confirmou esta hipótese. (Fig. 7).

No sistema de filtração em gel com Sephadex G-200, comporta-se a substância inibidora igualmente como globulina sérica do tipo 19 S.

2-Mercapto-Etanol inativa globulinas do tipo 19 S embora não especificamente, o que não dá ao teste o valor de identificação de globulinas. A atividade inibidora nos

soros de bovino foi totalmente destruída após incubação com 2-Mercapto-Etanol. (Tabela 1). 2 ml de soro bovino diluídos a 1/3 foram misturados com 2 ml de 2-Mercapto-Etanol (0,4 M) e guardados uma noite a 4°C. Desta mistura 0,2 ml foram misturados com 0,2 ml de <sup>32</sup>P-Poliiovírus marcado e incubados durante uma hora a 37°C. Adiciona-se 2 ml de tampão fosfato/Tris, 0,04M, 1,6M de tampão Hanks/Tris e 1 ml de gel de hidróxido de alumínio. Após 10 minutos à temperatura ambiente o tubo foi centrifugado e a radioatividade do sobrenadante medida como já descrito. (Tubo A). Como controle foram preparados os seguintes tubos os quais foram de maneira semelhante tratados: Tubo B: 2 ml de soro de bovino com 2 ml de tampão Hanks/Tris; Tubo C: 2 ml de tampão Hanks/Tris com 2 ml de 2-Mercapto-Etanol (0,4 M); Tubo D: 2 ml de soro de bezerro com 2 ml de 2-Mercapto-Etanol (0,4 M). Os resultados são apresentados na Tabela 1.

Após 24 horas de ação, o inibidor foi destruído. No tubo A aparece o vírus no sobrenadante após centrifugação do gel de hidróxido de alumínio e no controle B permaneceu o complexo vírus-inibidor ligado ao hidróxido de alumínio. No controle C é determinado se o 2-Mercapto-Etanol tem alguma ação na adsorção do vírus ao hidróxido de alumínio e em D o vírus elui

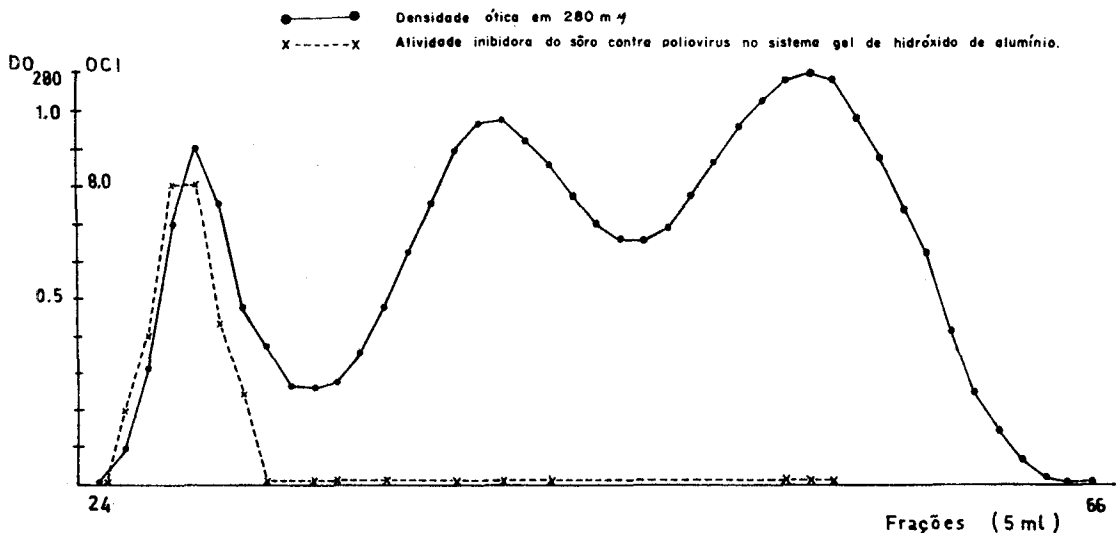


Figura 8: — Separação de um soro bovino através a filtração em Gel de Sephadex G-200.

normalmente do hidróxido de alumínio quando em presença do 2-Mercapto-Etanol e um soro não inibidor.

5 — *Investigações sobre a ligação entre o vírus e o inibidor*

Tabela 1

Ação de 2-Mercapto-Etanol sobre soros de bovino inibidores

Tubo A	Tubo B	Tubo C	Tubo D
786 # (100%)	93 (12%)	786 (100%)	726 (94%)

# Impulsos/Minuto.

Os inibidores contidos nos soros de bovino estudados comportaram-se como macroglobulinas do tipo 19 S não somente em DEAE-Celulose, em filtração em gel, em sedimentação em ultra-centrifugação e em presença de 2-Mercapto-Etanol, como também na maneira pela qual se ligam à superfície do vírus. Com a ajuda do sistema de gel de hidróxido de alumínio, investigou-se a labilidade do complexo vírus-inibidor em diversos valores de pH, em comparação a complexos semelhantes obtidos com vírus e anticorpos 7S e 19 S de coelhos. <sup>32</sup>P-Poliiovírus marcado foi incubado com soro de bovino contendo inibidor, e com soros de coelhos contendo imune-anticorpos 7 S e 19 S, tratados posteriormente com diversos tampões ácidos e finalmente examinados no sistema de gel-adsorção.

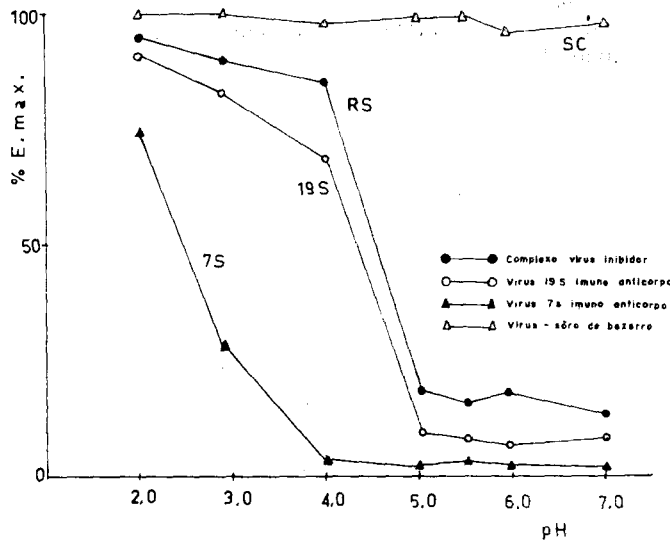


Figura 9: — Dissociação do complexo vírus-inibidor, vírus 19 S e vírus 7 S imune-anticorpos, pela ação do pH. Contrôles: vírus-soro de bezerro. Também usados: Tampão de glicina 0,1 M (pH 2,0 e pH 3,0), tampão de acetato 0,2 M (pH 4,0 5,0 e 5,5), tampão de fosfato 0,05 M (pH 5,9) e tampão de Hanks/Tris (pH 7,0).

Entre os valores de pH 4,0 e 5,0 desfaz-se a ligação entre o vírus e o inibidor e entre o vírus e os anticorpos 19 S, de maneira que o vírus, nas concentrações de fosfato usadas, elui da mesma maneira do que no controle. Os complexos contendo anticorpos 7 S desfazem-se somente em valores de pH mais baixos. O inibidor comporta-se assim da mesma maneira que os anticorpos 19 S em relação à ligação a superfície do vírus.

A cinética da neutralização e a análise dos produtos de reação entre poliovírus e soros contendo inibidores fazem supor que

os vírus sensíveis à ação de inibidores a eles se ligam, enquanto partículas resistentes de vírus permanecem livres no meio. Para esclarecer este aspecto, vírus marcados foram misturados com inibidores e em seguida precipitados com antiglobulina de bovino preparada em coelhos ("Coombs-test"). O soro de bovino usado para a imunização dos coelhos não continha inibidor para poliovírus.

Os resultados podem ser analisados na Tabela 2.

TABELA 2

Precipitação da amostra Mahoney bo<sup>+</sup> e bo 8 após incubação com soro de bovino n.º 8 e soro de bezerro com antiglobulina de bezerro preparada em coelho ("Coombs-test").

	bo 3 +SBez.	bo 8 +SB8	bo <sup>+</sup> +SBez.	bo <sup>+</sup> +SB8
+ A. gl. Bov.	725 #	650	365	310
+ S. Bez.	625	625	335	63

# Imp/Min.

A. gl. Bov. = Anti-globulina bovina

S. Bez. = Soro de bezerro

SB 8 = Soro de bovino n. 8

As amostras de vírus sensíveis bo<sup>+</sup> foram precipitadas no teste quando ligadas ao inibidor, permanecendo no sobrenadante quando em presença de soro não inibidor.

A amostra resistente de vírus não foi precipitada o que leva a conclusão de que esta última não se liga ao inibidor pelo menos em quantidade detectável pelo sistema de trabalho empregado.

Na figura 6a foi mostrado que uma determinada fração infecciosa não é neutralizada pelo inibidor. Esta atividade residual que equivale a cerca de 10% do título de vírus inicial permaneceu mesmo quando maiores quantidades de soro foram adicionadas à suspensão de vírus.

Visando esclarecer a natureza desta fração, investigou-se se ela liga-se ao inibidor *in vitro* ou não. Vírus marcado foi incubado com um soro inibidor. Em seguida a mistura foi diluída 1/10 e levada ao sistema de gel de hidróxido de alumínio. A radioatividade e a infecciosidade foram determinadas no eluato.

Os resultados são mostrados na figura 10. Verifica-se que a fração infecciosa residual comporta-se como um complexo vírus-inibidor, ou seja, esta fração liga-se primariamente ao inibidor e esta ligação secundariamente é dissociada quando da determinação do título infeccioso ou então esta fração permanece infecciosa apesar de estar unida ao inibidor.

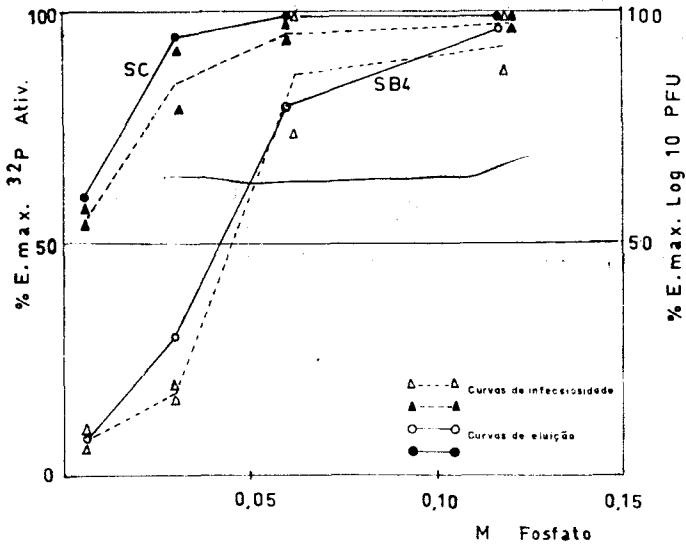


Figura 10: -- Titulação da infecciosidade em mistura de  $^{32}\text{P}$ -poliovírus Mahoney e soro bovino inibidor (nº 4) ou soro de bezerro livre de inibidor, após cromatografia em gel de hidróxido de alumínio.

E. max. (mistura com inibidor):  $4,6 \times 10^7$  PFU/ml; E. max. (mistura controle):  $4,6 \times 10^6$  PFU/ml.

Figura 10

A possibilidade de que a dissociação do complexo vírus-inibidor tenha ocorrido devido ao fator diluição é improvável, uma vez que experiências colaterais mostraram que em misturas diluídas 1/100 e assim mantidas por 1 a 2 horas antes da cromatografia mantêm-se seus componentes igualmente fortemente unidos, como quando diluídos a 1/10.

Substâncias contidas ao agar adicionado às culturas para determinação do título infeccioso (método de placas) poderiam desempenhar um papel dissociador do complexo vírus-inibidor na experiência apresentada na figura 10. Esta hipótese foi da seguinte maneira investigada:

Extratos de agar preparam-se segundo Agor e cols. (4). O preparo final não diluído, diluído 1/10 e 1/40, misturou-se em partes iguais com uma mistura vírus-soro inibidor a qual tinha sido incubada anteriormente a  $37^\circ\text{C}$  por uma hora, e em seguida novamente incubada na mesma temperatura e pelo mesmo tempo. A fração infecciosa residual foi determinada pelo mé-

todo de placas, sendo o agar usado nestes testes cuidadosamente lavado. Nenhuma diferença pode ser determinada em relação a um controle que não continha extrato de agar. Assim sendo, fica indicado que extratos de agar, os quais contêm polissacarídeos sulfatados em razoável quantidade, não exercem ação dissociadora pelos menos nas condições estudadas.

#### 6 — Diferentes especificidades dos inibidores de soro de bovino

Pagano e cols. (20) mostraram que existem soros de bovinos os quais apenas contra a amostra CHAT, atenuada do tipo 1, exercem uma ação inibidora, não porém contra a amostra Mahoney.

Na figura 11, é mostrado que dos 26 soros soros estudados, 4 não mostraram qualquer atividade inibidora, 4 mostraram o comportamento descrito por Pagano enquanto apenas um agiu contra a amostra Mahoney e não contra CHAT. Os demais mostraram uma ação maior ou menor contra ambas as amostras de vírus.

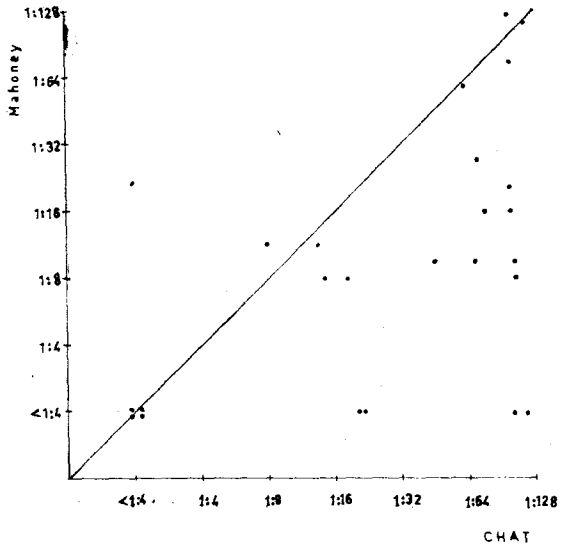


Figura 11: -- Comparação do título em gel de hidróxido de alumínio de 26 séros de bovinos contra as amostras Mahoney e CHAT de Poliovirus.

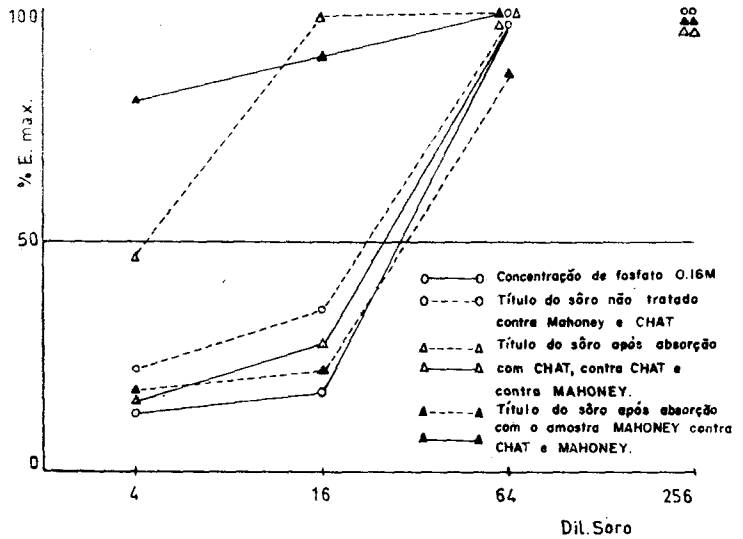


Figura 12: --- Teste de absorção com um soro ativo contra as amostras CHAT e Mahoney. Titulação do soro de gel de hidróxido de al. Concentração de fosfato 0,016 M e título do soro após absorção com CHAT, contra CHAT e contra Mahoney.

A diferente ação de soros bovinos contra as duas amostras de vírus deve ser devida a diferentes especificidades de pontos de adsorção para os inibidores na superfície do vírus. Ocorre por outro lado a pergunta se nos soros com atividade contra as duas amostras de vírus existem realmente inibidores dotados de atividade específica, ou seja, se estamos diante de misturas de inibidores com diferentes especificidades ou se estes inibidores, por exemplo, contêm duas especificidades por moléculas. Estas considerações levaram à realização de testes de absorção de capacidade inibidora sendo usados o soro n.º 8, o qual apresentava igual ação inibidora contra Mahoney e CHAT. Como apresentado na figura 12, a absorção deste soro com CHAT não modifica apreciavelmente o título contra Mahoney e vice-versa.

Da experiência acima conclui-se que o soro n.º 8 contém uma mistura de inibidores, os quais apresentam cada um uma especificidade diferente. Além disso, conclui-se que as amostras Mahoney e CHAT não possuem nenhum ponto de adsorção idêntico em relação aos inibidores contidos neste soro.

Em uma população de vírus Mahoney foi possível selecionar uma amostra resistente contra ação do soro de bovino n.º 8, amostra esta que permaneceu sensível à ação de outros soros bovinos ativos contra Mahoney. O mesmo ocorreu em relação à uma mutante resistente da amostra CHAT. Dêstes resultados, pode-se concluir apenas, pelo menos até o momento, que os inibidores contra a amostra Mahoney não são homogêneas em relação à sua especificidade, de maneira que deve supor-se a existência de vários pontos de absorção na superfície da partícula do vírus para os diferentes inibidores.

## DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Dos diversos inibidores citados na literatura os quais agem sobre a multiplicação do vírus da pólio (veja Introdução) são os descritos por Takemori os até hoje melhor estudados (29). A possibilidade de serem estes inibidores estudados por técnicas idênticas às usadas para a determinação de anticorpos neutralizantes, faz supor que a ação dos inibidores se faz diretamente sobre a partícula de vírus. Pagano e cols.

(21) mostraram que a ação inibidora está localizada na fração macroglobulina do soro, através filtração em Sephadex G-200. Além disso, a precipitação da fração globulina também precipita a atividade inibidora.

Estas observações conduziram à hipótese de que os inibidores presentes no soro bovino seriam macroglobulinas chamadas algumas vezes "anticorpos naturais". Esta denominação põe em relêvo nosso desconhecimento da sua origem, bem como do grau de especificidade do antígeno que provoca seu aparecimento. Os "anticorpos naturais" são encontrados por exemplo no soro de coelhos, não sendo possível distingui-los, sob o ponto de vista de sua natureza e capacidade de reação, dos anticorpos do tipo 19 S que são obtidos quando se injeta no mesmo animal pequena dose de poliovírus e se colhe o sangue poucos dias após (25).

Os inibidores presentes em soro de bovino apresentam porém uma característica que os distingue dos anticorpos de macroglobulina: é possível obter mutantes de poliovírus as quais não mais são suscetíveis à ação dos inibidores. E estas mutantes tanto podem ser selecionadas em laboratório, como ser encontradas na natureza populações de vírus resistentes contra um determinado soro. Este fato pode ser usado para estudos genéticos de recombinação (13) bem como para identificação de amostras (20).

Para estudos com inibidores, as técnicas comuns de investigação, ou seja, a determinação da infecciosidade residual através testes de neutralização em cultura de tecidos não são recomendáveis.

1 — A inoculação das misturas de vírus com soros inibidores em células introduz vários fatores de erro provenientes destas últimas. Por exemplo, a determinação do grau de resistência de uma amostra de vírus apresenta resultados bem diversos se fôr usada a multiplicação em presença do soro contido em placas ou a determinação da cinética da neutralização incubando o vírus anteriormente ao soro antes da inoculação nas células para a obtenção de placas.

2 — A fração residual infecciosa, ou seja partículas não resistentes que no entanto ainda são capazes de produzir placas ou efeitos citopatogênicos mesmo na presença de altas concentrações de soro inibidor, dificulta grandemente a interpretação dos resultados.



3 — A determinação da especificidade de um determinado inibidor só é possível de ser realizada através testes de absorção com amostras de vírus determinadas. Para isso são usadas de preferência amostras de vírus não inativadas, as quais, no entanto, ao serem inoculadas no sistema de células, trazem dificuldades para a leitura dos resultados.

Pelos motivos acima expostos, seria de grande utilidade o uso de um sistema para o estudo das relações vírus-inibidor, sem o emprêgo de células em cultura.

Aplicamos neste trabalho um método cromatográfico, o qual permite estudar a ligação entre vírus e inibidor e permite também uma titulação da capacidade inibidora de um soro bem como uma caracterização das substâncias inibidoras presentes. Além disso, é possível com a ajuda deste teste melhor caracterizar a fração residual infecciosa, sendo possível demonstrar que a mesma liga-se originalmente ao inibidor. Foi ainda possível realizar testes de absorção da capacidade inibidora de soros com vírus nativo testando-se em seguida o resto de atividade com vírus marcado.

O ponto de partida do trabalho consistiu em um método de trabalho no qual os complexos vírus-anticorpos são ligados mais firmemente a um gel de hidróxido de alumínio do que a vírus livre. Esta ligação depende praticamente com exclusividade da capacidade de ligação do anticorpo presente. (30, 31).

Incubando-se  $^{32}\text{P}$ -poliovírus com soro inibidor de bovino, o vírus também se ligará mais fortemente ao gel. Inicialmente foi demonstrado que o princípio ativo capaz de provocar esta união mais forte do vírus ao gel era o próprio inibidor, após fracionamento em DEAE-Celulose, através titulações comparativas de soros de bovinos, e o estudo do comportamento de amostras sensíveis e resistentes de vírus. Além disso foi provado que o inibidor une-se ao vírus através de precipitação do complexo vírus-inibidor com antiglobulinas adequadas.

A caracterização por nós feita dos inibidores de soro bovino confirmam e completam aquela feita por Pagano e cols. (21). A cromatografia em DEAE-Celulose e em gel de hidróxido de Al. fornecem elementos de prova para a presença de semelhantes propriedades de superfície dos inibidores e das macroglobulinas 19 S. Além

disso a filtração em Sephadex mostra um tamanho semelhante, a ultracentrifugação mostra uma igual velocidade de sedimentações e a inativação pelo 2-Mercapto-Etanol indica a presença comum de estabilizadores moleculares. A dissociação do complexo vírus-inibidor por baixos valores de pH corresponde exatamente ao que ocorre com os complexos vírus-anticorpos 19 S. Com todos estes elementos, é possível afirmar, com grande segurança, que a ação inibidora dos soros bovinos está ligada a uma molécula do tipo macroglobulina.

A especificidade do inibidor constitui matéria de discussão. Existe a possibilidade dos polissacarídeos presentes na molécula do anticorpo 19 S (cerca de 12%) exercerem uma ação sobre a união vírus-inibidor. Alguns polissacarídeos, como sulfato de dextrano ou polissacarídeos encontrados no agar, exercem uma ação inibidora sobre poliovírus, a qual parcialmente se deve a uma união do polissacarídeo ao vírus (17). De nossas pesquisas deduz-se que pelo menos o polissacarídeo de agar não exerce qualquer ação dissociadora sobre o complexo vírus-inibidor.

As experiências de absorção descritas sugerem a existência realmente de inibidores com diferentes especificidades ou seja inibidores dos quais é possível retirar uma especificidade contra a amostra Mahoney por exemplo sem alterar significativamente sua capacidade de unir-se à amostra CHAT e vice-versa.

Nestas condições, para que os inibidores sejam considerados idênticos aos anticorpos naturais torna-se necessário apenas demonstrar que é possível obtê-los através a imunização de animais com antígenos os quais possuam uma estrutura semelhante à superfície do vírus da pólio. Por via parenteral é possível obter anticorpos para o vírus da pólio em bovino (12). Não foi possível até a presente data infectar animais com o referido vírus e nessas condições obter uma formação de anticorpos (14). Também não existem descrições de imunização parenteral de bovinos com amostras resistentes a inibidores.

O fato de que os inibidores são demonstrados principalmente em soros de animais adultos e não em animais jovens, não significa de maneira irrefutável que o caráter seja adquirido, podendo tratar-se de um fenômeno de maturação. Além disso não

se deve generalizar os resultados aqui encontrados que representam apenas alguns animais, testados contra apenas duas amostras de vírus.

A chamada fração infecciosa residual já definida dificulta não só a seleção de mutantes resistentes, como a interpretação de experiências de recombinação e mutação espontânea. Nas pesquisas aqui descritas ficou demonstrado que esta fração é o resultado de relações complicadas entre o vírus, o inibidor e possivelmente o sistema de células usado. Os resultados mostram que esta fração está em condições de ligar-se ao inibidor. Esta ligação resiste nas manipulações do teste de adsorção, bem como a ação dissociadora dos polissacarídeos do agar. É provável que as células mesmas tenham uma ação dissociadora. Poder-se-á imaginar que a fração residual constitui uma parte da população normal de vírus, a qual se une a moléculas de inibidor de baixa atividade, e esta união não é liberada por inibidores de alta capacidade de união. Nestas condições, parte da população de vírus está sujeita a ser liberada do inibidor com mais facilidade, provavelmente como acima exposta, pela própria célula ou por outros fatores ainda desconhecidos.

O comportamento da fração infecciosa residual após incubação com soro inibidor de bovino corresponde exatamente aos dados obtidos por Philipson (22) em relação à fração infecciosa residual que se observa após incubação com poliovírus de imunocorpos dos tipos 19 S e 7 S.

De uma população de poliovírus da amostra Mahoney a qual é inibida por um determinado soro bovino, foi possível isolar

uma amostra de vírus resistente ao referido soro, ocorrendo o mesmo em relação à amostra CHAT. Estas amostras resistentes permanecem sensíveis aos demais soros bovinos. Takemori et cols. (29) cultivaram mutantes duplas resistentes a diferentes soros bovinos. Dêstes resultados deve-se admitir a existência, na superfície da partícula de vírus, de diferentes pontos de ligação para os inibidores. Surge então a pergunta: quais seriam as relações entre estes pontos e os pontos de ligação dos anticorpos tipo específicos para o vírus da pólio. Como mostrado na figura 6b, estas mutantes de vírus permanecem sensíveis aos anticorpos 19 S e 7S. Isto indica, embora não de maneira absoluta, diferentes pontos de união para os inibidores e os anticorpos. Sobre a estrutura dos antígenos próprios de tipo na partícula de vírus da pólio pouco é conhecido. Teoricamente pode-se admitir a existência de um mosaico de componentes na superfície do vírus, os quais poderiam mutar individualmente, sem que estas pequenas modificações chegassem a influir na união do anticorpo tipo específico do vírus. Os inibidores do soro bovino nestas condições, ligar-se-iam apenas a algumas partes do antígeno total deixando livres as demais partes.

Múltiplos pontos de união na partícula de vírus, as quais podem mutar separadamente, constituem o ponto de partida para o desenvolvimento de um sistema de análise da superfície do vírus da pólio, que eventualmente teria aplicação para a identificação de amostras de vírus conhecidos, como já descrito no caso da amostra CHAT (20).

## S U M M A R Y

*Inhibitors in some bovine sera, active against Poliovirus type 1, strains CHAT and Mahoney, have been examined in Al (HO) gel system. The inhibitor belongs to the 19-S macro-globulins as could be shown by Sephadex-200 gel filtration, fractionation through DEAE-Celulose and centrifugation in sucrose gradient.*

*Besides that the inhibitor could be destroyed through treatment with 2-Mercapto-Ethanol.*

*The inhibitor combines with the virus surface in absence of cells. The complex virus-inhibitor was precipitated by the use of anti-bovine-globulin serum; the complex virus-inhibitor dissociates by the same pH value as the complex virus-19 S antibody.*

*The author was able to show that by the neutralization of Poliovirus with bovine serum, in a cell system, the called "rest-infectiosity" (about 10%)*

represents a partial dissociation of virus particles which have been first bound to the inhibitor.

Resistant strains against specific bovine sera have been obtained. These strains, however, were still sensible to other bovine sera, as well as to 19-S and 7-S Polio antibodies. Through absorption experiments the presence of mono-specific activity of certain bovine sera, against the strains CHAT and Mahoney of Poliovirus has been shown.

## BIBLIOGRAFIA

- 1 — AGOL, V.I. and CHUMAKOVA, M. Y. — An agar polysaccharide and marker of poliovirus. *Virology*. 17: 221, 1962.
- 2 — ARMSTRONG, G. — Successful transfer of the Lansing strain of poliomyelitis virus from the cotton rat to the white mouse. *Pub. Health Rep.* 54: 2302, 1939.
- 3 — BARTELL, P. and KLEIN, M. — Neutralizing antibody to viruses of poliomyelitis in sera of domestic animals. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 90: 597, 1955.
- 4 — BENGSTSSON, S. and PHILIPSON, L. — Countercurrent distribution of polioviruses type 1. *Virology*. 20: 176, 1963.
- 5 — DULBECCO, R. and VOGT, M. — Plaque formation and isolation of pure lines with Poliomyelitis viruses. *J. Exper. Med.* 99: 167, 1954. 1959.
- 6 — DULBECCO, R. VOGT, M. and STRICKLAND, A.G.R. — A study of the basic aspects of neutralization of two animal viruses, Western equine encephalitis virus and poliomyelitis virus. *Virology*. 2: 162, 1956.
- 7 — FAHEY, J. L. and HORBETT, A.P. — Human gamma-globulin fractionation on anion exchange cellulose columns. *J. Biol. Chem.* 234: 2645, 1959.
- 8 — FLEXNER, S. and LEWIS, P.A. — Experimental poliomyelitis in monkeys. Eighth note: further contributions to the subjects of immunization and serum therapy. *J. Am. Med. Assoc.* 55: 662, 1910.
- 9 — GARD, S. — Immune-inactivation of polioviruses. *Arch. ges. Virusforsch.* 7: 49, 1957.
- 10 — GERLOFF, R.Ö., HOYER, B.G. and MAC LAREN, L.C. — Precipitation of radiolabeled poliovirus with specific antibody and antiglobulin. *J. Immunol.* 89: 559, 1962.
- 11 — HAMMON, W. MC D., MACK, W.N. and REEVES, W.C. — The significance of protection tests with the serum of man and other animals against the Lansing strain of poliomyelitis virus. *J. Immunol.* 57: 285, 1947.
- 12 — HAMPIL, B., MELNICH, S.L., WALLIS, G. BROWN, R. W., GRAYE, E.T. ADAMS, R.R. JR. — Preparation of antiserum to enteroviruses in large animals. *J. Immunol.* 95: 895, 1965.
- 13 — HIRST, G.K. — Genetic recombination with New-Castle Disease virus. Poliovirus and Influenza. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 27: 303, 1962.
- 14 — KLEIN, M. — The significance of human antiviral neutralizing substances in animal sera. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 70: 362, 1958.
- 15 — LEDINKO, N. — Genetic recombination with Poliovirus type 1. Studies of crosses between a normal horse serum-resistant mutant and several guanidine resistant mutants of the same strain. *Virology*. 20: 107, 1963.
- 16 — LEVINTOW, L. and DARNELL, J.E. — A simplified procedure for purification of large amounts of poliovirus: Characteristics and amino-acid analyses of type 1 poliovirus. *J. Biol. Chem.* 235: 70, 1960.
- 17 — MANDEL, B. — Reversibility of the reaction between poliovirus and neutralizing antibodies of rabbit origin. *Virology*. 14: 316, 1961.
- 18 — MC FERRAN — Poliovirus-neutralizing substances in cattle sera. *J. Path. Bact.* 83: 73, 1962.
- 19 — MC FERRAN, J.B. — A Substance in sera of man and animals neutralizing a bovine enterovirus. *J. Path. Bact.* 83: 83, 1962.
- 20 — PAGANO, J.S. and BÖTTINGER, M. — Studies of the vaccine virus isolated during a trial with an attenuated poliovirus vaccine prepared in a human diploid cell strain, including use of a strain specific bovine serum inhibitor. *Arch. ges. Virusforsch.* 15: 19, 1964.